

Title	^3H - ^1H 交換反応による視物質高次構造の研究
Author(s)	世古口, 雄三
Citation	大阪外国語大学学報. 46 p.35-p.50
Issue Date	1980-03-01
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/80762
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

^3H - ^1H 交換反応による視物質 高次構造の研究

世 古 口 雄 三

Conformational Study of Rhodopsin by Means of ^3H - ^1H Exchange Technique

Yuzo SEKOGUTI

Cattle and squid rhodopsin-digtonin complexes (rhodopsin micells), which had been incubated with tritiated water, were passed through a column of Sephadex G 25 for removing free tritiated water. The tritiated rhodopsin micells were mixed with free water to estimate the rate of ^3H - ^1H exchange-out reaction. The cattle rhodopsin micell displayed slower exchange-out reaction at acidic pH than at alkaline pH, and also the reactions were accelerated with irradiation at both pHs. In the case of squid rhodopsin micell, the promotive effect of light was observed in the early period of irradiation.

Assuming that the preparations used in the present experiments contain only rhodops in molecules, the numbers of exchanged hydrogen atoms per a rhodopsin molecule were calculated at 81-101 according to the formula described by Englander. It was also suggested that two to three exchangeable hydrogens are exposed by light in the cattle preparation and the numbers of such hydrogen atoms are three in the squid one. Furthermore, compared with the data described by Downer & Englander and Osborne, the results obtained in this experiment were discussed in some details about the origins of exchangeable hydrogens exposed by light.

脊椎動物の視物質・ロドプシンは網膜の杆体外節 (ROS) 内円板膜中に局在して、円板膜タンパク質の 85% 以上を占め^{1), 2)}, この視物質としての糖タンパク質が、円板膜のラメラを貫通して存在していると考えられている^{3)~10)}. 視物質は光を吸収することにより、光エネルギーを電気現象に転換する「引金作用」として視覚初期過程に直接関与するといわれている。さて

視物質が光退色するに伴い、まず早期受容電位 (ERP) が発生し¹¹⁾、次いで晩期受容器電位 (LRP) が誘導される。これは暗状態では視細胞の外節部分に Na-current が流入しているのが、照射で外節の形質膜の電気抵抗が増すことで過分極性電位を発生するに至る¹²⁾。これが細胞外からは ERP 及び LRP となって誘導されるに至るものと考えられる。上記の細胞内電位が過分極を生ずる機構として、Ca-仮説が提出され、視細胞外節で照射をうけると円板膜に存在する視物質の構造変化から膜透過性の変化を生じ、円板膜中に含まれていた Ca-イオンが細胞質中に放出され、これが Transducer として、形質膜に存在し、暗状態で開放されていた Na-Channel を閉じるに至ると仮定した¹³⁾。この Ca-モデルの実証として、視細胞のうち ROS が光で脱分極を生じ、Ca-イオンを放出するとの主張¹⁴⁾をはじめ、多くの実験が行なわれている^{cf. 15)}。しかし ^{45}Ca - ^{40}Ca 交換系をウシ網膜の ROS で調べた結果からは、Ca-モデルを直接実証できないで、なお検討を要するとしている¹⁶⁾、また、光退色ロドプシンの燐酸化^{17), 18)}やウシ網膜の ROS 中に含まれる cGMP を開裂するフォスフォディエステラーゼ (PDE) が光で活性化される¹⁹⁾ことが知られ、これらの代謝系の役割が Ca-モデルと関連して注目されてきたが^{cf. 15), 20)}、最近では網膜 ROS 中に光誘導で生ずる 30K タンパク質 (あるいは 30K/30K-P の増大) が Transduction として役立つ²¹⁾とか、“Negative CG Transmitter” の系を考える²²⁾などの仮説が提出されて、何れも Ca-モデルの考えより優れていると主張している。従って ROS 中に含まれる視物質・ロドプシンの光化学反応に由来する引金作用に端を発する現象を問題にしていることは間違いないので、光退色に伴うロドプシンの高次構造変化が注目される。ロドプシンの高次構造の研究については、すでに UV 域での差吸収^{23), 24)}、ORD (旋光分散)²⁵⁾、CD (円二色性)^{26), 27)}などの測定による検討など多くの実験が行なわれてきた^{cf. 15), 28)}。著者らは研究グループ活動の一部として、 ^3H - ^1H 交換技術に注目し、ウシロドプシンのジキトニン抽出液 (ロドプシン液) に ^3H を含む水 (THO) を加え、ロドプシン・ジキトニン錯化合物 (ロドプシン・ミセル) を ^3H -ラベルし、主に交換放出 (Exchange-out) 反応からロドプシンの高次構造を追究する実験を試みてきた。この ^3H -交換反応は高分子化合物 (重合体) やタンパク質などの構造研究に有力な道具として使われ^{29)~31)}、特にペプチド鎖中の水素の状態の検出に役立つ³¹⁾とされている。この立場から光退色に伴うロドプシンの構造、特にオプシンの高次構造変化に注目して、ラベルしたロドプシン・ミセルにみられる交換放出反応とその速度に対する光効果を調べてきた。実験結果の一部は既に報告されている^{32), 28)}。ところが、最近、Downer & Englander³³⁾、Osborne, H. B.³⁴⁾ が相次いで、 ^3H -交換法を用いて、ロドプシンの構造、とくに ROS 中のこの視物質の高次構造を追究した実験結果を発表した。両者で膜中でのロドプシンの存在状態に対する考察が異なり、われわれがえた光効果の結果とも必ずしも一致していない様である。本論文では、ウシロドプシン液だけでなく、イカロドプシン液でも同様な実験を行なったので、それもとり上げ、先述の異なった結果とわれわれの結果とを検討することにした。

なお本研究実験は吉沢透博士（現京大・理・生物物理・教授）と協同行なわれたものであり、実験結果は昭和50年8月（1975）日本学術審議会援助による日米交流シンポジウムとして米国イリノイ大学で行なわれた際発表したものを引用したことを特にことわっておきたい。また本研究は1部文部省科学研究費をうけ実施されたものである。

§ 実験材料と方法

動物材料：ウシの場合はと殺場から死後10分以内の新鮮な摘出眼をえて氷箱に暗保し、研究室に運んだ。網膜はく離は氷冷しながら、暗室、赤ランプのもとで行なわれた。

イカの場合は、山陰島根半島の漁港で主としてケンサキイカ (*Dorytenthos Kensaki*) を購入、新鮮な材料から暗室で眼球摘出を行ない、マホウ瓶中にドライアイスで冷凍保存して研究室に運び、ディープ・フリーザーに貯え、必要に応じて使用した。

ロドプシンの抽出：ウシロドプシンの調製には、はく離網膜50枚を集め、普通に用いられる砂糖の比重差を用いた勾配沈澱法²⁴⁾を少し改良し、出来るだけ純度を高くする方法で、ROSを調製した。操作はすべて暗室赤ランプのもとで氷冷しながら行なわれている。分離したROSは明バン固定と石油エーテル処理を行なった後、2%ジキトニン液 (M/15 磷酸緩衝液, pH 6.46) でロドプシンを抽出した。

イカロドプシン抽出の場合には、明バン固定と石油エーテル処理とは共に行なわず、ウシの場合以上によく水洗してから2%ジキトニン液 (M/10 磷酸緩衝液, pH 6.1) を用いた。イカの試料は実験7のみに使用された。

^3H - ^1H 交換反応に用いたロドプシン液は予めコロジオンバッグ (Pharmachia 製) で濃縮した。ウシロドプシンの場合で $\Delta A_{500\text{nm}}$ は3~5、イカでは $\Delta A_{485\text{nm}}$ が7.2~7.8であった。また分光学的純度は、ウシロドプシンでは、 $P_{400/500}$ が0.23~0.31、 $P_{278/500}$ が2.8~3.5であり、イカでは $P_{390/485}$ が0.28~0.35、 $P_{278/485}$ が3.0~3.5であった。

^3H -交換取込み (Exchange-in) 反応：ロドプシン液中に THO を加え (37~100mc)、暗保のまま 3°C で4~7日間インキュベートした。次いでこの液をセファデックス (Sephadex) G 25 を10cmの高さにつめたカラム (直径 1.2cm) に通し、溶出するロドプシン分画を集めてラベルされたロドプシン・ミセルを調製した。ラベルされたロドプシン液は0°Cで氷冷し約1時間暗保した後、次の実験に用いられた。

ラベルされたロドプシン・ミセルからの ^3H -交換放出反応：ラベルされたロドプシン液を試験管に分注し (各 0.5ml づつ)、照射実験群と対照群とに分け、0°C で 560nm 以上の橙色光で実験側を照射し、一定時間毎に各アリコートを両群から同時にとり出して液体窒素で凍結固定した。その後、液体窒素をトラップにしたガラスの特製凍結乾燥機で十分に脱水乾燥した。

放射能測定：乾燥標品を 0.3ml のテトラエチルアンモン・ハイドロオキシドと 8ml のエタノールに溶かし、DPO (2,5-diphenyloxazole, 4g/toluene, 1l) と POPOP [p-bis-2 (-5-

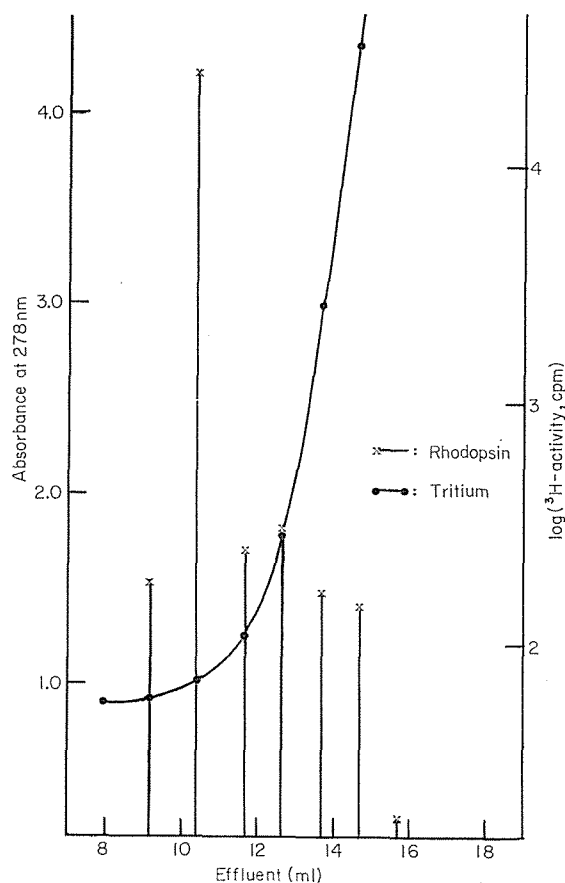
phenyloxazolyl) benzene, 0.1g/toluene, 1*l*) とを含むシンチレーション混液 10ml を加え、液体シンチレーション・スペクトロメーター (Packard 製の Tri-Carb 並びに Nuclear Chicago 製) で標品中の ^3H -放射能を測定した。

§ 実験結果

実験 1. ロドプシン分画から遊離 THO の分離

ロドプシン液に THO を混ぜた後、直ちにセファデックス・カラムにこの混液を通し、M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.46) で溶出させ、1ml ずつの分画に分けて、それぞれのロドプシン量 ($A_{278\text{nm}}$ のオプシン量で示す) と ^3H -放射能とを測定した。結果は図 1 に示す。この実験には ^3H の全放射能が 50mc であったから、ロドプシン分画のうち (10~14ml) 後から出る 1 部分 (全体の約 1/4 容位) を除去すると、遊離 THO に由来する ^3H の混入は僅少であることが判明した。

Fig. 1. Separation of Rhodopsin Micell from Free THO by Sephadex Column

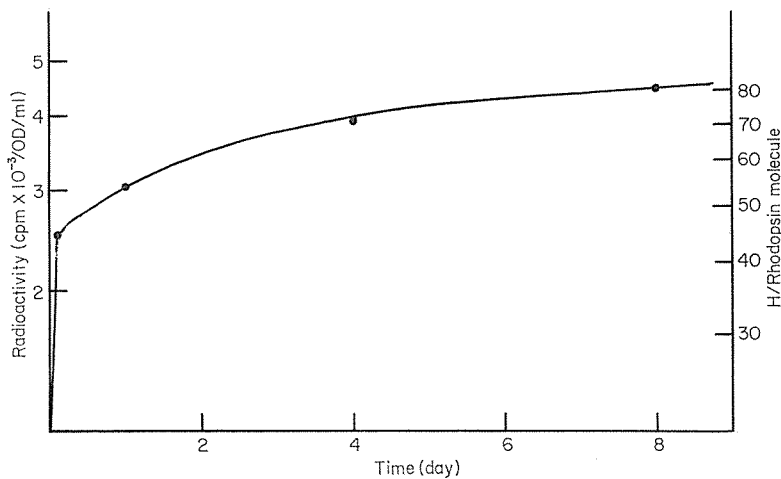


実験 2. ロドプシン・ミセルへの ^3H -交換取込みの時間経過

ロドプシン液と THO とを混合した反応液を 3°C で16日間暗保し、一定時間後アリコートを取り出し、ロドプシン・ミセルへの ^3H の交換取込みを調べた。結果は図 2 に示す。

Fig. 2. Exchange-in Reaction in Cattle Rhodopsin Micell

Rhodopsin: $\text{OD}_{500\text{nm}}$; 3.6, $\text{P}_{400/500}$; 0.26, $\text{P}_{278/500}$; 2.8
Incubation: THO; 50mc, 3°C , pH 6.46, in the dark



この結果、約 4 日までに、1) 1 時間以内に終る速い取込み、2) 数時間で交換される取込み、3) それ以上の時間を経て交換されるおそい取込みの、少なくとも 3 過程が存在することが分った。そこで交換放出反応の実験では、交換取込みに 4 日乃至 7 日間を費すことにした。

実験 3. ロドプシン・ミセルへの ^3H -交換取込みに対する光効果

ロドプシン液 ($\Delta A_{500\text{nm}}$: 3.0, 3ml) に THO (100mc) を加え、pH 6.46, 3°C で 4 日間交換取込み反応をさせた後、標品を照射側と対照 (暗保) 側とに等分し、照射側を 560nm 以上の橙色光で 20 分間照射した。その後両群とも 3°C で暗保して 1 日後と 2 日後にそれぞれアリコートを取り出し、ロドプシン・ミセルへの ^3H -交換取込み量を測定した。結果は表 1 に示す。

Table 1. Effect of irradiation on the rate of ^3H exchange-in reaction to cattle rhodopsin micell

Time	0	After irradiation 1 day 2 days	
		(cpm/ $A_{278\text{nm}}$ /ml)	
Dark	690	699	1,058
Irradiated		1,076	1,061

表中 0 時間の数値は、光照射を行なう直前の放射能測定値である。この結果は、2 日迄の間

に、一時的に交換取り込み速度が促進される様な光効果を示したが、操作上均一性がえにくく、十分検討を要することが考えられたので、光の影響を観察するには、交換放出反応速度に対して行なう方が望ましいと判断された。以後の実験条件にはこの交換放出反応を選んでいる。

実験 4. ロドプシン・ミセルの ^3H -交換放出速度に対する pH の影響

ラベルされたロドプシン・ミセルから ^3H -交換放出される速度が反応液の pH で異なるかどうかを観察した。 ^3H -ラベルの条件は他の実験と同様であったが、ラベルされたロドプシン液の分画は三等分して後、一定量のアルカリで pH を調整した（約20分間を要した）。各アリコートには等濃度のロドプシンを含むような一定容量に保った。この場合のロドプシン量は $\Delta A_{500\text{nm}}$ が 0.44 であった。さらに調整された pH は 5.05, 5.95, 7.20 で、8 以上の試料はえられていない。

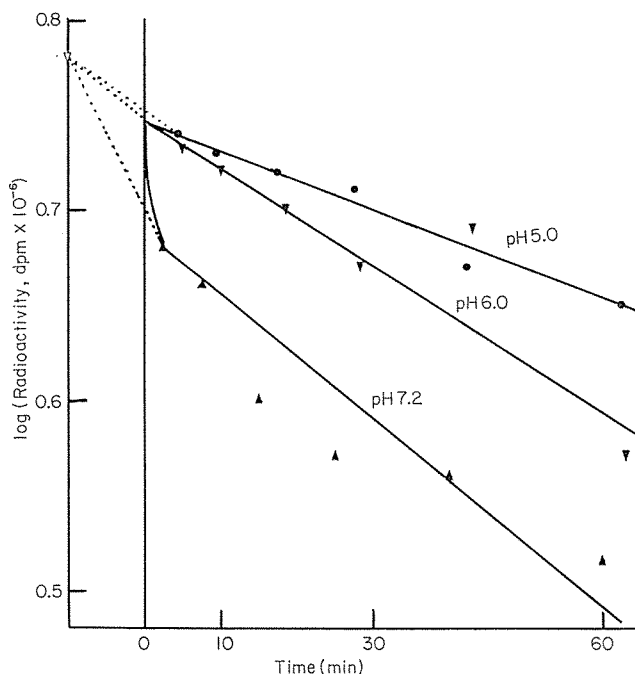
結果を示す図 3 をみると、時間と共にロドプシン・ミセルにラベルされた ^3H は急速に失なわれるが、酸性に傾く程緩徐になる傾向を示した。恐らく酸性に傾く程、交換可能な水素原子を含む基が溶媒効果（水への接近度）をうけにくい様に埋没する（タンパク分子の疎水性領域に入り込む）様な結果を示した。

Fig. 3. Effect of pH on exchange-out Reaction in Cattle Rhodopsin Micell

Rhodopsin: P_{400/500}; 0.26, P_{278/500}; 3.5

Exchange-in: THO; 50mc, 3°C, pH 6.46, 4 days, in the dark

Exchange-out: 3°C, in the dark



この傾向は後述の実験 6-ii) での暗側の試料を比較しても観察された。すなわち、標品の反

応液の pH をみると、酸性試料は 6.46 で、図 5-b に示す方の pH は 9.2 であり、ラベルしてから交換放出実験を始める 1 時間後では、アルカリ側が酸性側に比し、放射能が約 1/3 に減少しているのが観察された。

実験 5. ラベルされたロドプシン・ミセルの交換放出速度に対する光の影響

ラベルされたロドプシン液を折半し、1 半を交換放出の実験を行なう直前 20 分間、10°C で 560nm 以上の可視光で照射した。その間他半を対照として暗置した。照射後は試料を 3°C で暗置し、テスト側と対照側の両方から、アリコート 0.5ml づつを取り出し液体窒素で固定した。取り出す時間間隔は 10 分、1 時間、2、3、5.5、7.5 の各時間毎である。各アリコートは同時に凍結乾燥してロドプシン・ミセルに残存する放射能を測定した。結果は図 4A に示される^{322, 282}。放射能を示す縦軸をログ目盛で表現すると図 4B の (a) のようになった。これらの図を観

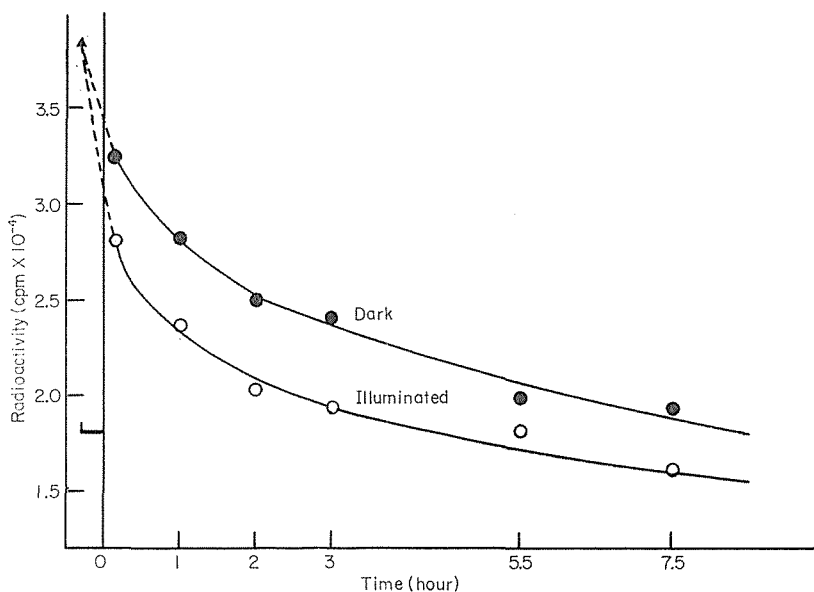
Fig. 4A. Exchange-out Reaction in Cattle Rhodopsin Micell

Rhodopsin : 6.0ml, OD_{500nm} ; 4.2, P_{400/500} ; 0.23, P_{278/500} ; 2.6

Exchange-in : THO ; 100mc, 3°C, pH 6.46, 7 days

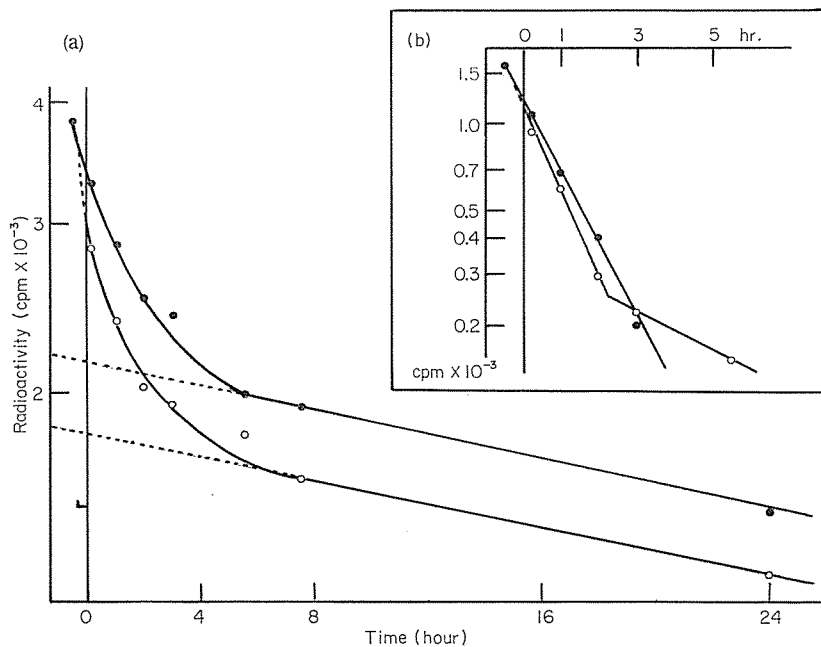
Irradiation : Orange light (>560nm), 10°C, 20min.

Incubation : 3°C, in the dark



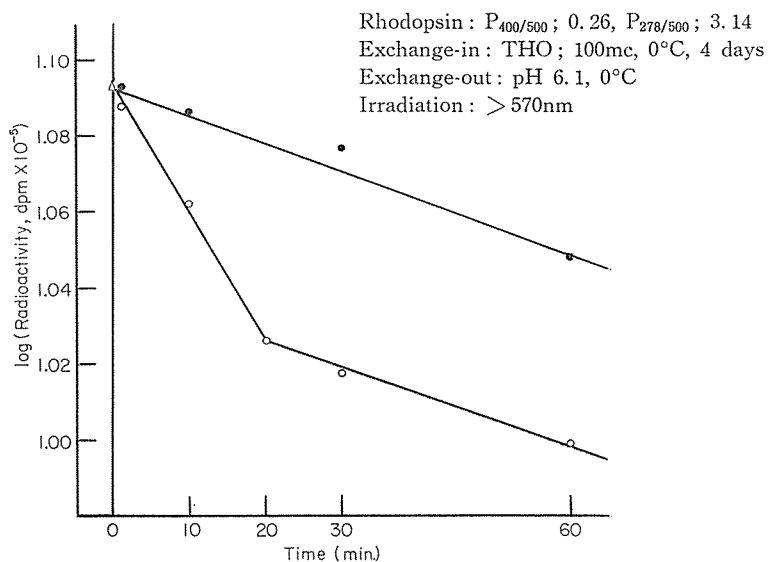
察すると、照射後 2 時間位までの間に、テスト側が交換放出の初速度を増加し、少なくとも 5.5 時間以後はテスト側も対照側も交換放出速度が殆ど等しくなることが判断された。これを確かめる為に、等速度の傾斜を考慮して (図 4B-(a) の点線が縦軸と交叉する値を差引く操作を行なって) 初期の数時間を改めて図示すると、図 4B の (b) のようになり、明らかにテスト側では、光によって初期速度 (約 2 時間後まで) が促進されたことを示す直線がえられた。

Fig. 4B.



実験 6. 照射中にみられるラベルされたロドプシン・ミセルからの³H-交換放出速度
³H-交換反応に対する照射の直接効果をみる為に, 0°C で交換反応させている間橙色可視光で照射した. 反応液の pH は 6.1 と 9.2 とであった.

Fig. 5-a. Effect of pH on Exchange-out Reaction in Cattle Rhodopsin Micell during Continueing Irradiation

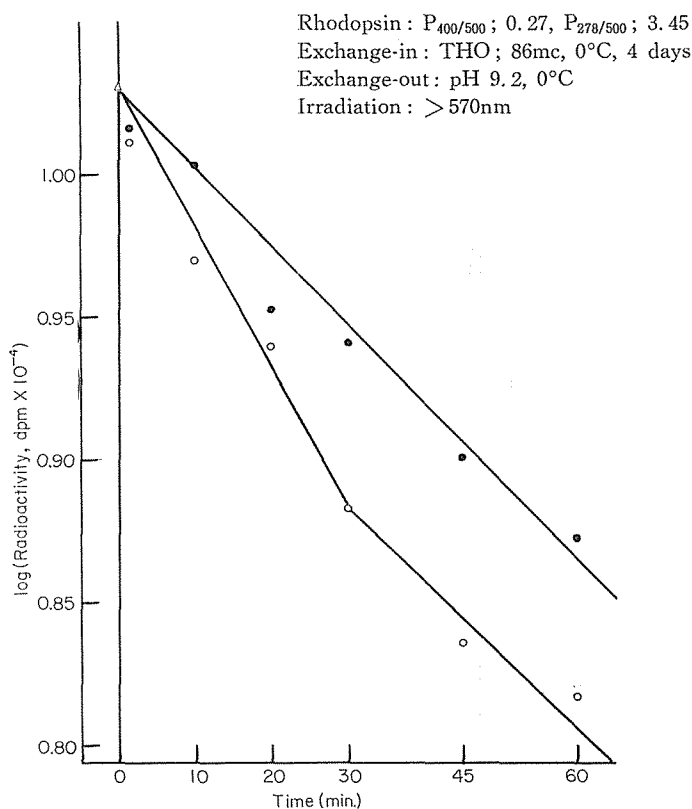


i) 反応液の pH が 6.1 で光効果をみた場合：照射開始後，1分，10分，20分，30分，60分間隔にアリコートを取り出した．その後の操作は前実験と同様である．結果は図 5-a に示され，照射側が20分後まで交換放出速度が増大し，以後は照射されているに拘らず暗側と殆ど等速度で交換反応の進むことが分った．

ii) pH 9.2 の場合：ラベルされたロドプシン液はアルカリ性で光影響をみる前に予め二部分に分け，一部分を pH 6.46 に調整しおき，アルカリ側と比較する目的で同じ条件で照射した．結果としては30分照射の標品のみがえられている．然し i) の実験結果と同傾向を示し，テスト側が対照側に比し，約10%放射能を減少していた．なお，次に示すアルカリ性での標品と実験開始前の条件で比較すると酸性側が約3倍放射能が高く，アルカリ側がより交換され易い水素を含む基の多くなることが判明した．

アルカリ性での実験は，アリコートを取り出す時間間隔として酸性の場合より1条件多く，45分間隔を加えた．光効果をみた結果は図 5-b に示す．照射側の速度勾配をみると i) の酸性の場合と似た傾向を示し，特に増大するようなパターンは観察されなかった．

Fig. 5-b. Effect of pH on Exchange-out Reaction in Cattle Rhodopsin Micell during Continueing Irradiation



実験 7. イカのロドプシン・ミセルを使った場合の光効果

イカロドプシン液もウシの場合と同様条件で ^3H -ラベルを行なった。照射の影響をみる場合は、分光学的な測定も考慮して、ラベルされたイカロドプシン液を pH 9.2 に調整した。照射実験はラベルしたロドプシン液を取り出してから約 1 時間後に開始した。照射光には 570nm 以上の可視光を用い、5, 10, 20, 30, 45, 60 の各分毎にアリコートのテスト側と対照側とを同時に取り出し、それぞれの分画に含まれるロドプシン・ミセルの残存放射能を測定した。結果は図 6-a に示される。ウシの場合同様に、イカでも光による ^3H -交換放出速度が促進されることが分った。しかしこの促進効果はウシの場合と異なり、照射 5 分までは大きく、以後速度を示す曲線は傾斜を緩め、約 20 分以後は殆ど暗側と等速度の直線になることを示した。

この実験に用いた試料の別のアリコートで実験条件と同様に暗保したものをを用いて対照とし実験と同じ照射条件でロドプシンを退色させて分光学的に調べてみると、図 6-b に示すようなスペクトルがえられた。図から、照射 5 分後に $A_{485\text{nm}}$ が 25.5% 減少し（スペクトルの 1）10 分後にはその度合が 29%（スペクトルの 2）になり、以後吸収は見かけ上増加するようなスペクトルを示しながら、30 分後はスペクトルの 2（10 分後）と同じ吸収スペクトルをとり、変化

Fig. 6-a. Effect of Light on Exchange-out Reaction in Squid Rhodopsin Micell

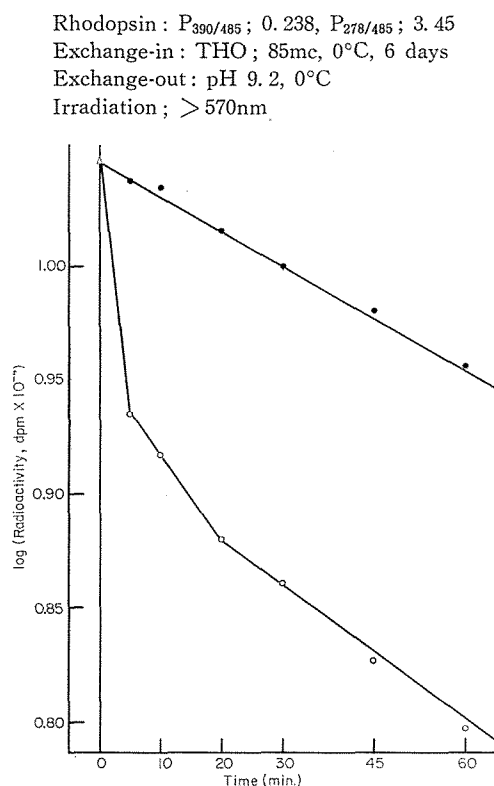


Fig. 6-b. Spectral Changes of Squid Rhodopsin

An aliquot of the preparation was irradiated under the same conditions as in Fig. 6-a.

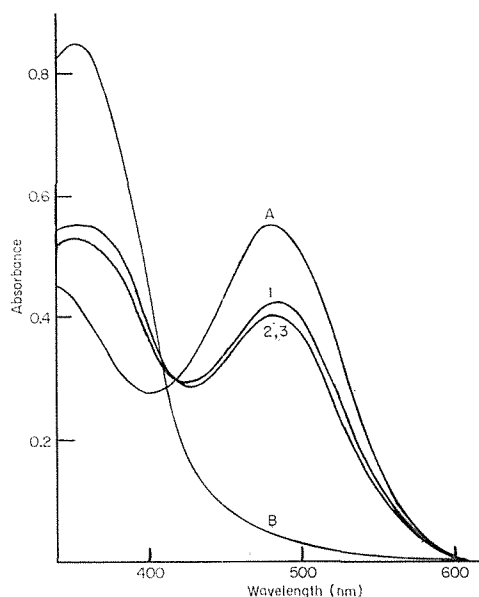
Curve A: Before irradiation

Curve 1: 5min. after irradiation.

Curve 2: After 10min.

Curve 3: After 20min.

Curve B: Bleached by heating at 90°C for 2min.



しなくなった。みかけ上約70%もロドプシンが残存したような結果であった。

ロドプシン・ミセル中に含まれる交換可能な水素原子の数の計算について

ロドプシン中の交換可能な水素原子の数を N として、標品（ロドプシン・ミセル）中のタンパク質はすべてロドプシン分子のみとみなすと、 N は Englander により記載された次式で計算される³⁰⁾。

$$N \text{ (H/molecule)} = \frac{C/D}{C_0} \times 111 \times \varepsilon_p \quad (1)$$

C_0 : Tritium activity in the preparation-tritium equilibration mixture

C : Tritium activity in the rhodopsin micell

D : Absorbance of rhodopsin in the aliquot of the preparation

111: Gram atoms of hydrogen per liter of water

ε_p : Molar extinction coefficient of cattle and squid rhodopsin as 40,600 or 35,000

本実験では、技術的な誤りが出て、この計算に使える標品が少なかったが、実験2で用いたウシの試料を用い4日後の標品からえられた数値で計算してみると $N=81$ の値をえた。また実験 6-ii) に使った標品で、ラベルされた直後のものを用いて計算すると $N=101$ になった。

しかしこの試料も実験に移る際には、約1時間経て、pH調整の操作を行なっているが、pH 6.46側で $N=72$ 、pH 9.2では $N=23$ におちていた（約1/3になることは前述した）。

次に、ウシのロドプシン・ミセルから放出される ^3H の放射能から交換される水素原子の数を計算してみると、実験6のデータから、反応液が pH 6.1の場合、光効果でより交換され易くなった水素原子の数は、照射20分後で2ケとなり、pH 9.2では30分以上経てからであるが3ケとなった。なお、実験7で観察したイカの試料では、光効果で交換され易くなった水素原子の数は照射5分経過して2ケになり、20分後になると3ケになる計算値がえられた。

§ 考 察

交換取込み反応について

セファデックス G 25 を用いたクロマトグラフィでは遊離 THO を分離することは大変有効な方法である³⁰⁾ ことが図1に示す結果から判明したが、本実験では欠点としてその操作に5～15分間を要し、急速に失われる交換可能な水素を含む基は検出されなかった。特に交換放出の実験には上記カラムから取り出した試料は1時間暗保してから使用しているのでむしろおそく交換する水素を含む基を焦点において実験したことになる。従って、Englander ら³¹⁾ が考えた様に、本実験では、主としてペプチド鎖中の水素を対象に交換反応を観察していたことになるかも知れない。

実験2から本実験条件では ^3H -交換取込みに約4日を要しているが、Osborne³⁴⁾ は室温1日前後で行なっている。われわれは THO の放射能を考え、低温を考えて実施したのでよりおそく交換される基の水素はラベルされにくかったかも知れない。しかし抽出条件などその他の実験条件の差に由来するとも考えられる。

計算されたロドプシン一分子当りの交換される水素原子の数は実験2から81、実験6からは101の値をえた。ウシロドプシンのアミノ酸分析の結果^{35), 36)} や最近検討されている分子量の値^{37), 38)} から分子量を35,000～40,000とみてみると、アミノ酸は296乃至322の数値になり、平均値をとれば、ロドプシンのタンパク質オプシンには約308のペプチド結合手をもつことになる。前述のように、本実験でえた交換された ^3H -放射能からえた水素原子数が、すべてペプチド鎖に由来するとすると、26～33%が緩徐に交換される基になる。大きい値をとると、Azuma and Kito³⁹⁾ がウシロドプシンに含まれるヘリックス量が34.6%とする値に近い。ところで Downer and Englander³³⁾ の結果では交換された水素の全量はペプチド結合手当たり1.05の値でペプチド結合手300中約200のペプチドプロトンが遊離しているとしたが、Osborne³⁴⁾ が調べた結果では、必ずしもそのように判断されないとして、 ^1H - ^2H 交換反応法を使い赤外スペクトロメーターで調べた結果も考慮し⁴⁰⁾、ペプチド鎖中の交換しにくい水素が約40%であると主張して、この部分は恐らく溶媒が近づきにくい疎水性領域を形成し、ヘリックス構造をなしていると考えている。ROS の円板中に存在する場合には、このヘリックス

構造の部分がそのまま、リポド 2 分子層に埋没していると考えられる^(cf. 9), 10)。またロドプシンのヘリックス構造全量は 50~60%に達するが^{(41)~(43)}、表面活性剤で抽出するとその 25%はヘリックスを失う⁽⁴³⁾ので、本実験で計算された交換可能な水素数 26%は、そうしたペプチド鎖の状態の差違に由来するともいえる。また前述の交換水素数 81~101 と値が一定しなかったのも、実験条件の差だけでなく、抽出ロドプシンのヘリックス量に差異を生じていた為かも知れない。なお、ロドプシンには β -構造が検出されないとのこと⁽⁴⁴⁾なので、恐らく他のペプチド鎖の部分は早く交換されるものと思われる。

なおイカロドプシン液では、pH 調整に硼酸塩を使いアルカリ性にしたが、ウシの場合に比し、 ^3H -ラベルされた時の放射能が大変低い値を示した。Osborne の知見では⁽³⁴⁾、燐酸塩を含む反応液では ^3H の交換取込みが大きく反応速度が促進されることを示しているが、ウシとイカとで異なったのはこの燐酸塩の場合とその濃度の薄まった場合の差で、同じ傾向を観察したものと考えられる。

交換反応における光効果について

実験 3 で、 ^3H -交換取込み反応速度に対する光の影響をみて、一時的にその速度を促進する結果をえたが、なお、検討を要するのでむしろ技術的に信頼度の高い交換放出反応系を使用することにした。ところで、Downer らが⁽³³⁾ウシでみた結果退色ロドプシン即ち オプシンでは ^3H -交換放出反応が抑制される傾向を示し、実験 3 の場合に類似している。しかしカエルの試料で照射初期の交換放出反応（メタロドプシン II 生成過程）の結果は本実験 5~7 と同傾向を示している。従って光効果は、この様に ^3H -交換放出反応の速度を促進するとみる方が信頼出来る結果と判断し考察を進めたい。

さて実験 5 では、図 4A に示す光照射の影響は、ログ目盛で表現し直した図 4B-(a) からみて、照射し終った直後から ^3H -交換放出反応速度が速められたことを示唆し、後半でテスト側が対照の暗側と等速度になることからそれを考慮した光照射直後の初速度をみた図 4B-(b) から確められると考えた。ただし、この実験は暗保—光照射—暗保と実験条件を変えている。そこで後半の暗保を止め、照射側と対照の暗側で比較する条件にして調べ、さらに、反応液の pH を酸性側とアルカリ側と条件を変えて観察することにした。実験 6 がその結果で、条件を変えても光効果は同傾向を示すことが分った。ところで、光照射で交換され易く溶媒に露出するようになった基の水素原子数はロドプシン 1 分子当り酸性側で 2、アルカリ側で 3 であった。実験 4 から酸性の方がアルカリ性より交換されにくいこと、光退色過程での酸性とアルカリ性との中間産物のできる段階の差がみられることなどに由来して前記の交換水素数の差が出たのであろう。すなわち 0°C でロドプシンが光退色すると、酸性ではメタ・ロドプシン II の中間産物が多く生成（以後の変化が抑制）するし、アルカリ性ではメタ・ロドプシン I から N-レチニリデン・オプシンへの変化をたどるとされている^(cf. 28)。このような中間過程の差に対応するオプシン高次構造の変化の差を示唆しているのかも知れない。また実験 7 でみたイカ標品では、交

換水素原子数が時間的に2の段階をへて3へ増大する経過を示した(図6-a). イカロドプシンの光退色過程は複雑で、メタ・ロドプシンIとIIの関係、さらにそれらより光で再生する過程などについて、いろいろの中間産物が検討されているようであるし、図6-bからも、スペクトル変化が時間的に対応して複雑化していることを示唆しているので、多くの検討が必要であるが、恐らくオプシンの高次構造が変化するにつれ、交換される基の水素が二段階にわたり光で露出することだけは確められたと考える。

さて、光効果で新たに交換され易くなった(溶媒に露出し易くなった)基の水素数2乃至3の由来として、ペプチド鎖に由来するとすれば、ヘリックス量が減少したことになる。これは量が少なすぎるようにも考えられる。Osborne ら⁴⁰⁾は赤外スペクトルからえた知見と、³H-交換実験³⁴⁾の結果から、ロドプシンでは、おそく交換される水素は、ペプチド鎖(恐らくH-結合)中のものよりもむしろ交換されにくい側鎖を考えることが重要であると主張している。最近、ロドプシンに含まれるSH基に関する知見から^{cf. 15), 45), 46)}、タンパク質部分の6ケのSH基のうち、2ケが埋没していて、光で1ケが露出し、他の1ケはメタ・ロドプシンI以後の退色過程に関与することを考察している。このような新生の露出基の水素が本実験で検出されたと考えるか、ロドプシンの発色団レチナールがオプシンと結合するシッフ塩基のプロトン化の水素が露出することが関与すると考える方が合理的であるかも知れない。一応ペプチド鎖、とくに水素結合を含むヘリックス構造を考えるより新たに光で露出する側鎖が考え易いとする立場をとるが、なお多くの条件の検討が必要であろう。しかし要約して、本実験でえた結果は、ロドプシンとくにオプシンの高次構造を考察する上にある程度の情報を提供しえたものとする。

§ 総 括

視物質としてウシとイカのロドプシンをとりあげ、ジキトニン抽出にTHOを混ぜてロドプシン・ミセルに³H-ラベルを行なった。その結果、反応液のpHが6.46、3°Cで4日ないし7日間交換取込みを行なわせたところ、Englanderの式³⁰⁾からおそく交換される水素の数は、試料のタンパク質をすべてロドプシンとすれば、81~101の値がえられた。またこの取り込みは3°C、pH 6.46で暗保して行なわれると約4日で平衡に近く到達することが分った。

次に³H-交換放出については、反応液のpHがより酸性の方がその速度がおそくなると分ったが、光の影響をみた場合には、照射後の初期の間に放出速度が促進され、ウシの試料では、反応液がpH 6.1で新たに交換されるようになった基の水素の数はロドプシン当り2ケと計算され、pH 9.2では3ケになった。イカではこの光効果は始め2ケ次いで3ケと2段階に交換される水素を生ずる結果をえた。

これらの交換された水素の由来について、Downer ら³³⁾とOsborne³⁴⁾のえた知見を引用して考察を試みた。

§ 謝 辞

本研究は大阪大学理学部生物学教室で実施され、 ^3H -ラベルの実験は同学部放射線施設同位元素実験室で行なわれた。当時の教授で本研究に種々便宜を与えられ、激励と批判とを頂いた故本城市次郎博士に深謝し、このささやかな論文を霊前に捧げたい。また本実験の一部に参加し、討論に参加した鈴木竜夫博士並びに技術的援助をうけた堀内真理氏にも謝辞を述べたい。

§ 文 献

- 1) Daemen, F. J. M., De Grip, W. J. & Jansen, P. A. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 271 (1972) 419.
- 2) Heitzmann, H.: *Nature New Biol.*, 235 (1972) 114.
- 3) Sardet, C. Tardieu, A. & Luzzati, V.: *J. Mol. Biol.*, 105 (1976) 383.
- 4) Wu, C-W. & Streyer, L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69 (1972) 1104.
- 5) Charbre, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 382 (1975) 322.
- 6) Klip, A., Darszone, A. & Montal, M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 72 (1976) 1350.
- 7) Röhlich, P.: *Nature*, 263 (1976) 789.
- 8) Krebs, W. & Kähm, H.: *Exp. Eye Res.*, 25 (1977) 511.
- 9) Fung, B. K-K. & Hubbell, W. L.: *Biochemistry*, 17 (1978) 4403.
- 10) Osborne, H. B., Sardet, C., Michel-Villaz, M. & Chabre, M.: *J. Mol. Biol.*, 123 (1978) 177.
- 11) Brown, K. T. & Murakami, M.: *Nature*, 201 (1964) 626.
- 12) Tomita, T.: *Quart. Rev. Biophys.*, 3 (1970) 179.
- 13) Hagins, W. A.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1 (1972) 131.
- 14) Hagins, W. A. & Yoshikami, S.: *Exp. Eye Res.*, 18 (1974) 229.
- 15) 吉沢透・河村悟: *生体の科学*, 27 (1976) 11.
- 16) Schnetkamp, P. P. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 554 (1979) 441.
- 17) Bownds, D., Dawes, J., Miller, J. & Stahlman, M.: *Nature New Biol.*, 237 (1972) 125.
- 18) Kühn, H. & Dreyer, W. J.: *FEBS Letters*, 20 (1972) 1
- 19) Milki, N., Kierns, J. J., Marcas, F. R., Framan, J. & Bitensky, M. W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 (1973) 3820.
- 20) 三木直正: *蛋白質・核酸・酵素*, 21 (1976) 605
- 21) Farber, D. B., Brown, B. M. & Lolley, R. N.: *Vision Res.*, 18 (1978) 497.
- 22) Liebman, P. A. & Pugh, E. N. Jr: *Vision Res.*, 19 (1979) 375.
- 23) Takagi, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 66 (1963) 328.
- 24) Sekoguti, Y., Takagi, M. & Kito, Y.: *Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci., Osaka Univ.*, 12 (1964) 67.
- 25) Kito, Y. & Takezaki, M.: *Nature*, 211 (1966) 197.
- 26) Crescitelli, F., Mommart, W. F. & Shaw, J. I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 56 (1966) 1729.
- 27) Takezaki, M. & Kito, Y.: *Nature*, 225 (1967) 1197.
- 28) 原富之・吉沢透: *光感覚の分子生理*, 共立出版, 1973
- 29) Hvidt, A. & Nielsen, S. O.: *Adv. Protein Chem.*, 21 (1966) 887.
- 30) Englander, S. W.: *Biochemistry*, 2 (1963) 798.
- 31) Englander, S. W., Downer, N. W. & Teitelbaum, H.: *Ann. Rev. Biochem.*, 41 (1972) 903.
- 32) Honjo, I.: in "Aspects Cell. Mol. Physiol.", *Ann. Rep. Biol. Works, Fac. Sci., Osaka Univ.*, 19 (1972) 200-201.

- 33) Downer, N. W. & Englander, S. W. : J. Biol. Chem., 252 (1977) 8092, 8101.
- 34) Osborne, H. B. : FEBS Letters, 67 (1976) 23.
- 35) Heller, J. : Biochemistry, 7 (1968) 2914.
- 36) Kropf, A. : in "The Vertebrate Retina, ed. by Rodieck, R. W.", W. H. Freeman & Comp., 1973, p. 250.
- 37) Makino, M., Hamanaka, T., Orii, Y. & Kito, Y. : Biochim. Biophys. Acta, 495 (1977) 299.
- 38) Kossi, C. N., Mungsr, G. & Leblanc, R. M. : Vision Res., 17 (1977) 917.
- 39) Azuma, M. & Kito, Y. : Ann. Rep. Biol. Works, Fac. Sci., Osaka Univ., 15 (1967) 59.
- 40) Osborne, H. B. & Navedryk-Viala, E. : FEBS Letters, 84 (1977) 257.
- 41) Schichi, H. & Shelton, E. : J. Supramol. Struc., 2 (1974) 7.
- 42) Stubbs, G. W., Smith, H. G. Jr & Litman, B. J. : Biochim. Biophys. Acta, 425 (1976) 46.
- 43) Albeat, A. D. & Litman, B. J. : Biochemistry, 17 (1978) 3893
- 44) Rothschild, K. J., Andrew, J. R., De Grip, W. J. & Stanley, H. E. : Science, 191 (1976) 1176.
- 45) Daemen, F. J. M., Van Beugel, P. J. G. M., Jansen, P. A. A. & Bonting, S. L. : Biochim. Biophys. Acta, 453 (1976) 374.
- 46) Delmelle, M. & Virmaux, N. : Biochim. Biophys. Acta, 464 (1977) 370.